

# Non-cyclic chelating agents based on aminodialkylphosphoros oxides for the preparation of technetium or rhenium complexes.

**Publication number:** DE4408729 (A1)

**Publication date:** 1995-09-21

**Inventor(s):** STAHL WILHELM DR [DE]; WALCH AXEL DR [DE]; DOLL WILHELM [DE]; KUHLMANN LUDWIG DR [DE]; PUETTER DIETRICH [DE]

**Applicant(s):** HOECHST AG [DE]

**Classification:**

- international: A61K51/00; A61K51/04; C07B59/00; C07F9/38; C07F9/40; C07F13/00; C09K3/00; A61K51/00; A61K51/02; C07B59/00; C07F9/00; C07F13/00; C09K3/00; (IPC1-7): C07F9/38; A61K31/66; A61K51/00; C07F9/44; C07F9/58

- European: C07F13/00B; A61K51/04L8; A61K51/04P; C07B59/00F; C07F9/38A1; C07F9/40A1

**Application number:** DE19944408729 19940315

**Priority number(s):** DE19944408729 19940315

**Also published as:**

EP0672673 (A1)

CA2144588 (A1)

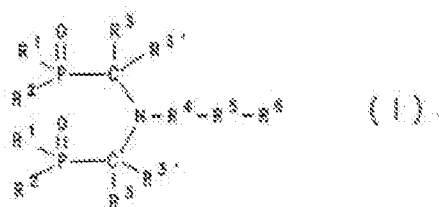
JP7278166 (A)

NO950971 (A)

**Abstract not** available for DE 4408729 (A1)

**Abstract of corresponding document:** EP 0672673 (A1)

Subst. aminodialkylphosphonic acids of formula (I) are new: R<1> = OH, NH<sub>2</sub>, or SH; R<2> = H, OH, NH<sub>2</sub>, SH, 1-4C alkyl, Ph, Bz, 1-4C alkoxy, OPh, OBz, 1-4C alkylamino, PhNH<sub>2</sub>, BzNH<sub>2</sub>, 1-4C mercaptoalkyl, thiophenyl, or mercaptobenzyl; R<3>, R<3'> = H or 1-4C alkyl; R<4> = 1-6C alkylene, 7-15C aralkylene, or a direct bond; R<5> = NH<sub>2</sub>, OH, SH, CH<sub>2</sub>, CH(R<7>), CH(NH<sub>2</sub>), CH(OH), or an ester or amide gp; R<6> = N<sub>3</sub>, halo, or SH; or COOH when R<5> = CH<sub>2</sub>, CH(R<7>), (CH(NH<sub>2</sub>)) or CH(OH); 6-vinyl-pyridyl-2-ylmethyl or haloacetyl when R<5> = NH<sub>2</sub>, OH or SH; or 1,4-dioxo-but-2-en-1,4-diyl or =C=S when R<5> = NH<sub>2</sub>; R<7> = side-chain of natural amino acid.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide



⑬ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 44 08 729 A 1

⑳ Aktenzeichen: P 44 08 729.2  
㉑ Anmeldetag: 15. 3. 94  
㉒ Offenlegungstag: 21. 9. 95

⑤① Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 07 F 9/38**  
C 07 F 9/44  
C 07 F 9/58  
A 61 K 51/00  
A 61 K 31/66

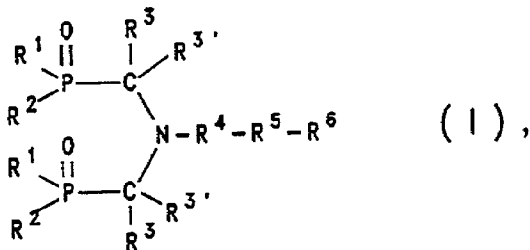
DE 44 08 729 A 1

⑦① Anmelder:  
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:  
Stahl, Wilhelm, Dr., 65929 Frankfurt, DE; Walch,  
Axel, Dr., 60487 Frankfurt, DE; Doll, Wilhelm, 64569  
Nauheim, DE; Kuhlmann, Ludwig, Dr., 65439  
Flörsheim, DE; Pütter, Dietrich, 65933 Frankfurt, DE

⑤④ Nichtcyclische Chelatbildner auf Basis von Aminodialkylphosphoroxiden zur Herstellung von Technetium- oder Rheniumkomplexen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft einen Chelatbildner zur Herstellung von stabilen Technetium- und Rheniumkomplexe der allgemeinen Formel (I)



Weiterhin betrifft die Erfindung ein Konjugat des genannten Chelatbildners mit einer Trägersubstanz, wie z. B. ein Antikörper.  
Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden zum Nachweis von Tumoren verwendet.

DE 44 08 729 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft nichtcyclische Chelatbildner auf Basis von Aminodialkylphosphoroxiden, ihre Verwendung zur Markierung von Substanzen mit insbesondere radioaktiven Technetium- oder Rheniumisotopen, sowie die Verwendung der Chelate in diagnostischen und therapeutischen Verfahren.

In den vergangenen Jahren wuchs das Verlangen, chemische Verbindungen mit radioaktiven Nukliden zu markieren. Vor allem im Bereich der medizinischen Diagnostik, wo pathologische Zustände bereits durch Substanzen angezeigt werden können, die im Organismus nur in ppm oder gar in noch geringeren Konzentrationen vorkommen, kann man heute nicht mehr auf radioaktiv markierte Substanzen verzichten.

Insbesondere Technetium-99m ist wegen seiner günstigen physikalischen Eigenschaften (Fehlen einer Korpuskularstrahlung,  $\gamma$ -Energie von 140 keV und Halbwertszeit von 6 Stunden) und der damit verbundenen geringen Strahlenbelastung zum wichtigsten Radionuklid in der nuklearmedizinischen Diagnostik geworden.

Technetium-99m, das sich aus Nuklidgeneratoren gewinnen läßt, liegt zunächst als Pertechnetat vor, das in dieser Form, z. B. für die Schilddrüsen- und Hirnszintigraphie geeignet ist. Die Szintigraphie anderer Organe mittels Technetium-99m gelingt mit Hilfe bestimmter "Transportsubstanzen", die einerseits in der Lage sind, Technetium zu binden und andererseits das Radionuklid im Zielorgan mit hoher Selektivität anzureichern. Zur Markierung der organspezifischen Transportsubstanz mit Technetium-99m muß das aus dem Nuklidgenerator eluierte Pertechnetat zuerst in eine niedrigere Oxidationsstufe übergeführt werden. In dieser reduzierten Form bildet Technetium mit der organspezifischen Substanz mehr oder weniger stabile Verbindungen. Für die Knochenszintigraphie werden z. B. Tc-99m-Phosphorsäure-Derivate, vor allem organische Phosphonsäuren, eingesetzt. So liegt in der im Europäischen Patent 002485 beschriebenen Markierungseinheit das Natriumsalz der 3,3-Diphosphon-1,2-propandicarbonsäure als organspezifische Transportsubstanz vor. In dem Europäischen Patent 108253 werden Tc-99m-Tri- und Tetraphosphonsäuren zur szintigraphischen Darstellung des Retikuloendothelialen Systems (RES), insbesondere der Leber, beschrieben. Der Tc-99m-Komplex mit Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) findet zur Diagnostik von Nierenerkrankungen bzw. pathologischen Hirnprozessen Anwendung.

Zur Markierung bestimmter Substanzen mit Technetium-99m und zur Herstellung von für den klinischen Routinebedarf geeigneten Testkits wurden spezielle Verfahren entwickelt und beschrieben. Zur Präparierung von Markierungsbestecken für biologisch interessante Makromoleküle, insbesondere Porphyrine, Dextrane, Cytochrome und Myoglobin, wird eine Methode beschrieben (G. D. Zanelli, D. Ellison, M. P. Barrowcliffe, Nucl. Med. Commun. 8, 199 bis 206, 1987), bei der die zu markierende Substanz zusammen mit p-Aminobenzoesäure und einer salzsauren  $\text{SnCl}_2$ -Lösung lyophilisiert wird. Zur Rekonstitution und Markierung dieses Kits gibt man Tc-99m-Generatoreluat, das vorher mit genügend Pufferlösung, z. B. Citrat-Natriumchlorid-Puffer pH 9,5, verdünnt wurde, hinzu. Für säureempfindliche Substanzen ist diese Methode jedoch nicht geeignet.

Bei einem anderen Verfahren (E. K. J. Pauweis, R. I. J. Feitsma, internationale Patentanmeldung WO 86/03010) wird durch vierstündiges Erhitzen in stark salzsaurer Lösung auf 140°C Tc-99m-Pertechnetat zuerst reduziert und an einer Verbindung, die eine Aminogruppe enthält, z. B. Dimethylformamid, gebunden. Das reaktionsfähige Tc-99m-markierte Zwischenprodukt, das als schwerlösliche kristalline Substanz ausfällt, wird in einer Pufferlösung, z. B. Natriumcarbonatlösung, durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit der zu markierenden Verbindung umgesetzt. Die Methode arbeitet zwar zinnfrei, ist aber wegen der aufwendigen Verfahrensschritte für die Routineanwendung kaum geeignet.

Zur Markierung von Proteinen, insbesondere Antikörpern, kennt man zwei verschiedene Wege. Bei der direkten Methode wird das reduzierte Technetium-99m durch Donorgruppen (Amino-, Amid-, Thiol- etc.) des Proteins gebunden.

Solche Verfahren sind in dem Europäischen Patent 005638 und dem US-Patent 4.478.815 beschrieben. Dort werden Zinn-II-Salze im Überschuß zur gleichzeitigen reduktiven Spaltung von Disulfid-Brücken und zur Reduktion des zugesetzten Tc-99m-Pertechnetats benutzt. Im allgemeinen benötigt man zur Spaltung der —S—S-Bindung längere Inkubationszeiten (24 Stunden), wobei  $\text{F(ab')}_2$ -Fragmente partiell zu  $\text{Fab'}$ -Fragmenten gespalten werden. Neuere Literaturangaben (z. B. Journal of Nuclear Medicine 27 (1986), Seite 685 bis 693 und 1315 bis 1320 sowie International Journal of Nuclear Medicine Biology 12 (1985) Seiten 3 bis 8) zeigen, daß das Verhältnis der beiden Fragmente abhängig ist von der "Bezinnungsreaktion" und daß sich das Verhältnis der beiden Komponenten nach der Tc-99m-Markierung nicht mehr nennenswert ändert, wobei die Hauptkomponente Tc-99m-markiertes  $\text{F(ab')}$  ist. In allen Fällen mußte das markierte  $\text{F(ab')}$ -Fragment nachgereinigt werden, da trotz mindestens 30-minütiger Reaktionszeit keine quantitative Umsetzung des Pertechnetats erreicht wurde.

Bei einer schnellen chemischen Methode zur Tc-99m-Markierung humaner Plasmaproteine (D. W. Wong, F. Mishkin, T. Lee, J. Nucl. Med. 20, 967 bis 972, 1979) wird Pertechnetat zuerst in saurer Lösung durch Zinn-II-Ionen reduziert und das reduzierte Technetium dann mit dem Protein umgesetzt.

Unter Zuhilfenahme von bifunktionalen Komplexbildnern läßt sich eine stabile Markierung von Substanzen mit Radioisotopen erreichen. In dem US-Patent 4.479.930 werden die cyclischen Anhydride von DTPA und EDTA als Chelatierungsmittel nicht nur für In-111 und Ga-67, sondern auch für Tc-99m angeführt. In dem europäischen Patent 35765 wird die Verwendung von Deferoxamin als Komplexbildner für Technetium-99m an Proteine erwähnt. In der internationalen Patentanmeldung WO 85/3063 werden die partiell reduzierten Disulfid-Brücken im Antikörper mit dem Natriumsalz des Tetrachlornitridotechnetats, das durch Reaktion von Pertechnetat mit Natriumazid vorher präpariert werden muß, umgesetzt. In der europäischen Patentanmeldung 194853 benutzt man ebenfalls durch Reduktion in Antikörperfragmenten erzeugte freie Thiolgruppen zur Bindung von [(7-Maleimidoheptyl)imino-bis(ethylenitrilo)]-tetraessigsäure als Chelatkomplex. Die Kupplung des Komplexes an den Antikörper erfolgt über die Reaktion der SH-Gruppen mit der Doppelbindung im Maleinimidteil der Komplexverbindung, während das radioaktive Metallion über die Nitrilodiessigsäure-Reste

komplexiert wird.

Metallothionein, ein metallbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 6000 und einem hohen Cysteinanteil im Molekül wurde als Komplexbildner in Antikörper eingeführt (G. L. Toman, R. J. Hadjian, M. M. Morelock et al, J. Nucl. Med. 25, 20, 1984). Durch Austausch mit Tc-99m-Glucoheptonat ließ sich das Antikörper-Metallothionein-Konjugat mit Technetium markieren. Der Austausch blieb jedoch unvollständig, so daß eine Nachreinigung erforderlich war. Mehrere Bisthiosemicarbazon-Liganden wurden ebenfalls als bifunktionelle Chelatbildner beschrieben (Y. Arano, A. Yokoyama, H. Magat et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 12, 425 bis 430, 1986). Der Tc-99m-markierte 1 : 1-Komplex zeigte eine gewisse Instabilität, während Komplexe mit einem höheren Verhältnis als 1 : 1 eine vermehrte Leberspeicherung aufwiesen. Die Kopplung eines Diamid-dimercaptid-N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-Liganden an Proteine (A. R. Fritzberg, S. Kasina, J. M. Reno et al., J. Nucl. Med. 27, 957 bis 958, 1986) erfolgt über eine zusätzliche funktionelle Gruppe. So wurde z. B. 4,5-Di(S-ethylcarbonylmercaptoacetamid)-pentanoyl-N-hydroxysuccinimid mit einem anti-Melanomantikörper umgesetzt. Das entstandene Konjugat wurde bei pH 8 und 50°C mit Tc-99m-Tartratlösung inkubiert. Nach einer Stunde waren 78% des Technetiums vom Tartrat auf den Antikörper übertragen.

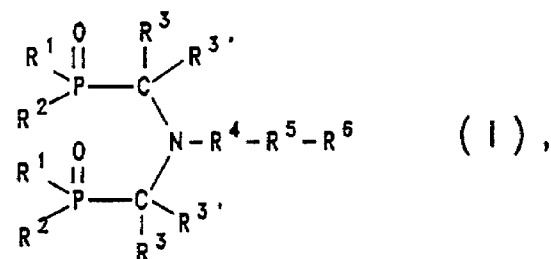
Um Technetium-99m diagnostisch breit nutzen zu können, ist es notwendig, dieses Nuklid in das zu untersuchende Organ selektiv zu transportieren. Aus anderen Organen oder Organsystemen sollte das Technetium-99m wieder schnell eliminiert oder überhaupt nicht hingebacht werden, um jede unnötige Strahlenbelastung für den Patienten zu vermeiden. Zu diesem Zweck werden bisher vorwiegend Substanzen eingesetzt, die direkt mit Technetium-99m markierbar sind und eine hohe Organspezifität aufweisen. Darüber hinaus gibt es jedoch eine Reihe von Substanzen, die zwar eine hohe Organspezifität aufweisen, aber nicht direkt markierbar sind. Dies können Proteine (Fibrinogen, Humanserumalbumin), monoclonale Antikörper, Antikörperfragmente, diagnostische Peptide (Amidinophenylalaninderivate; EP 0508220, EP 0513543), Enzyme (Streptokinase, Lactatdehydrogenase), Zucker (Dextran, Glucose) oder auch Polymere sein. Dazu gehören ebenfalls niedermolekulare Substanzen wie etwa Fettsäuren, die sich durch den hohen Energiebedarf des Herzens im Myocardgewebe anreichern. Um diese Substanzen markieren zu können, werden sie mit Komplexbildnern gekoppelt, die ihrerseits Technetium-99m fest binden können.

Als geeignete Komplexbildner für die Komplexbildung von Metallionen sind makrozyklische Amine, u. a. auch Cyclame, bekannt. Die Komplexbildungsausbeute liegt für den Technetium-Cyclam Komplex unter geeigneten Bedingungen bei 99%. Einzelheiten über Technetium-Aminkomplexe sind in D. E. Troutner, J. Simon, A. R. Ketrin, W. A. Volkert, R. A. Holmes, J. Nucl. Med. 21(1980), 443 oder S. A. Zuckmann, G. M. Freeman, D. E. Troutner, W. A. Volkert, R. A. Holmes, D. G. van der Keer, E. K. Barefield. Inorg. Ch. 20 (1981), 3386 oder J. Simon, D. Troutner, W. A. Volkert, R. A. Holmes, Radiochem. Radioanal. Lett. 47 (1981), 111 erwähnt. Auch substituierte Cyclame sind, sowohl am 1-Stickstoff, als auch am 6-Kohlenstoff substituiert, bekannt (A. R. Ketrin, D. E. Troutner et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 11(1984), 113 oder J. Simon, Diss. Abstr. Int. B42 (1981), 645 oder M. Struden, T. A. Kaden, Helv. Chim. Acta 69 (1986), 2081 oder E. Kimura, R. Machida, M. Kodama, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984), 5497).

Eine Reihe von Versuchen, Amin- und auch andere Liganden an Proteine zu konjugieren (s. Fritzberg et al., J. Nucl. Med. 27 (1986), 957 oder Tolman et al., J. Nucl. Med. 25 (1984), 20 oder Arano et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 12 (1986) 425) führten zu Produkten, die die hohen in vivo Stabilitätsansprüche nicht oder nur teilweise erfüllten.

Der vorliegenden Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, geeignete Chelatbildner zur Herstellung äußerst stabiler, insbesondere radioaktiver Technetium- und Rheniumkomplexe zur Verfügung zu stellen, die auf einfache Weise herstellbar und für die Markierung von Substanzen einsetzbar sind.

Die Lösung dieser Aufgabe gelang überraschenderweise mit substituierten Aminodialkylphosphonsäuren der Formel (I)



worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol,

R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyl, Phenyl oder Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyloxy, Phenyloxy oder Benzyloxy, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkylamino, Phenylamino oder Benzylamino, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Mercaptoalkyl, Thiophenyl oder Mercaptobenzyl sind,

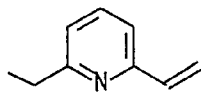
R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup>, gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl, sind,

R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>6</sub>-Alkyl oder ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-Aralkylen,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, Thiol, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist und

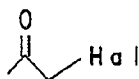
$R^6$  —COOH, sofern  $R^5$  —CH<sub>2</sub>—, —CH(R<sup>7</sup>)—, —CH(NH<sub>2</sub>)— oder —CH(OH)— bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino, Hydroxy oder Thio bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln IV oder V, sofern R<sup>5</sup> Amino bedeutet,

5



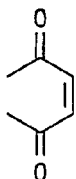
( I I )

10



( I I I )

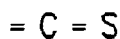
15



( I V )

20

25



( V )

oder —N<sub>3</sub>—, —Hal oder —SH ist, wobei Hal für Fluor, Chlor, Brom oder Jod steht und

30 R<sup>7</sup> die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

Insbesondere betrifft die Erfindung Verbindungen gemäß Formel (I), worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol

R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyl, Phenyl oder Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyloxy, Phenyloxy oder Benzyloxy sind,

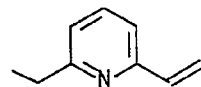
35 R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup>, Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>—C<sub>4</sub>)-Alkyl ist,

R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>6</sub>-Alkylen oder ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>—C<sub>15</sub>-Aralkylen ist,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, Thiol, eine Ester- oder eine Amidgruppe, —CH<sub>2</sub>—, —CH(R<sup>7</sup>)—, —CH(NH<sub>2</sub>)— oder —CH(OH)— ist und

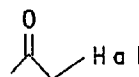
40 R<sup>6</sup> —COOH, sofern R<sup>5</sup> —CH<sub>2</sub>—, —CH(R<sup>7</sup>)—, —CH(NH<sub>2</sub>)— oder —CH(OH)— bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino, Hydroxy oder Thio bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln IV oder V, sofern R<sup>5</sup> Amino bedeutet,

45



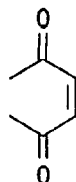
( I I )

50



( I I I )

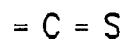
55



( I V )

60

65



( V )

oder —N<sub>3</sub>, —Hal oder —SH ist, wobei Hal für Chlor, Brom oder Jod steht und  
R<sup>7</sup> die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

Bevorzugt sind Verbindungen gemäß der Formel (I), worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol

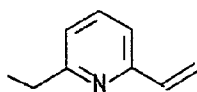
R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>3</sub>-Alkyl, Phenyl oder Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>3</sub>-Alkyloxy, Phenoxy oder Benzoyloxy sind,

R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup> Wasserstoff oder (C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub>)-Alkyl ist,

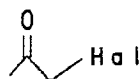
R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>5</sub>-Alkyl, ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>-Aralkyl ist,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, Thiol, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist,

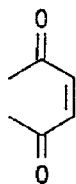
R<sup>6</sup> -COOH, sofern R<sup>5</sup> -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino-, Hydroxy- oder Thiogruppe bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln IV oder V, sofern R<sup>5</sup> Amino bedeutet,



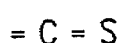
( I )



( III )



( IV )



( V )

oder Hal bedeutet, wobei Hal für Chlor, Brom oder Jod steht und

R<sup>7</sup> die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

Ganz besonders bevorzugt sind schließlich diejenigen Verbindungen gemäß Formel (I), worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol,

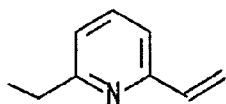
R<sup>2</sup> Hydroxyl, Amino oder unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>2</sub>-Alkyl sind,

R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup>, Wasserstoff ist,

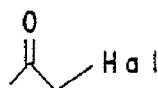
R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>5</sub>-Alkyl, ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>-Aralkyl ist,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist und

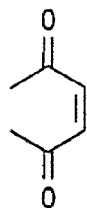
R<sup>6</sup> -COOH, sofern R<sup>5</sup> -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- bedeutet oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino- oder Hydroxygruppe bedeutet oder eine Gruppe der Formeln IV, sofern R<sup>5</sup> Aminogruppe bedeutet,



( I )



( III )



( IV )

oder Hal, wobei Hal für Chlor, Brom oder Jod steht und  $R^7$  die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

Unter proteinogener Aminosäure versteht man eine natürliche Aminosäure, insbesondere eine L-Aminosäure.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin einen Chelatkomplex, enthaltend eine oder zwei Verbindungen der Formel (I) und mindestens ein Technetium- oder Rheniumion. Bevorzugt sind Chelatkomplexe mit einem Technetium- oder Rheniumion.

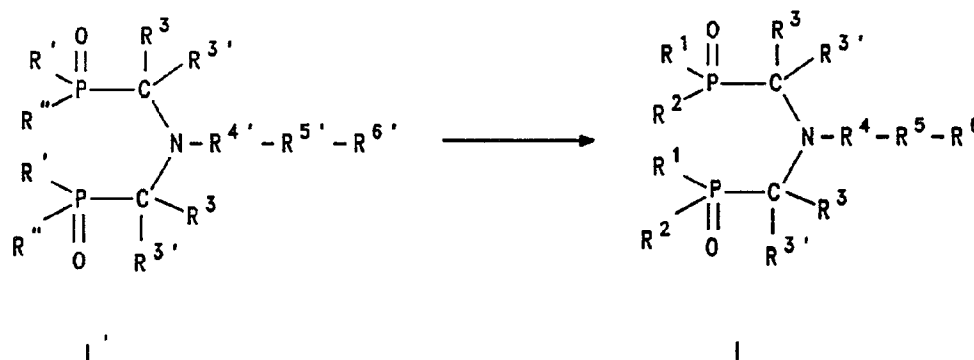
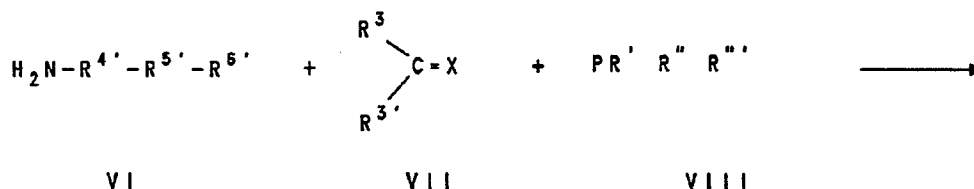
Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Konjugat enthaltend eine Verbindung gemäß Formel I und, über die Seitenkette  $R^6$  gebunden, eine "Substanz von diagnostischem und/oder therapeutischem Interesse". Unter "Substanzen von diagnostischem und/oder therapeutischem Interesse" werden in erster Linie solche Verbindungen verstanden, die in der medizinischen Diagnostik als "Transportsubstanzen" eingesetzt werden können, also meist organspezifische Substanzen, wie Antikörper, Antikörperfragmente [z. B.  $F(ab')_2$ - oder  $Fab'$ -Fragmente], Proteine (z. B. Fibrinogen), Peptide (z. B. Somatostatin), Oligonukleotide, Zucker (z. B. Dextran, Glucose) oder auch Polymere. Andererseits können aber auch generell solche Substanzen mit den erfindungsgemäßen nichtcyclischen Chelatbildnern bzw. daraus hergestellten Chelatkomplexen markiert werden, die mit deren funktionellen Gruppe an der Seitenkette unter Ausbildung einer chemischen Bindung reagieren. Gedacht ist hierbei z. B. an die "Überwachung" von chemischen Substanzen in Produktionsanlagen, die Bestimmung ihrer Konzentration, Strömungsgeschwindigkeit und Verweilzeit.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Chelatbildner auf der Basis von Aminodialkylphosphoroxiden erfolgt auf zwei unterschiedlichen Wegen.

a) Ausgehend von Verbindungen mit freien terminalen Aminogruppe der Formel VI, z. B. kommerziell erhältlichen Aminosäuren, werden alle vorhandenen funktionellen Gruppen, außer der Aminogruppe, wie literaturbekannt mit Schutzgruppen (Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition, T.W. Greene, P. G. M. Wuts, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991) blockiert. Die dann freie Aminogruppe kann z. B. zur Herstellung der Aminodialkylphosphoroxiderivate durch Reaktion einer Carbonylverbindung der Formel VII und einer Phosphorverbindung der Formel VIII umgesetzt werden. Das Reaktionsprinzip ist in Houben Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982, E2, S. 130 ff und S. 302 ff beschrieben. Nach Abspaltung der Schutzgruppen entsteht eine Verbindung der Formel I.

Schema I verdeutlicht die Reaktionsfolge.

Schema I



In Schema I bedeuten  $R^{4'}$ ,  $R^{5'}$ ,  $R^{6'}$  die mit Schutzgruppen versehenen Gruppen  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ , sofern  $R^4$ ,  $R^5$  und  $R^6$  eine Gruppe bedeutet, die geschützt werden kann und muß. X bedeutet Sauerstoff oder Stickstoff, der substituiert wird durch den Stickstoff bzw. den Phosphor der Verbindungen der Formeln VI bzw. VIII.

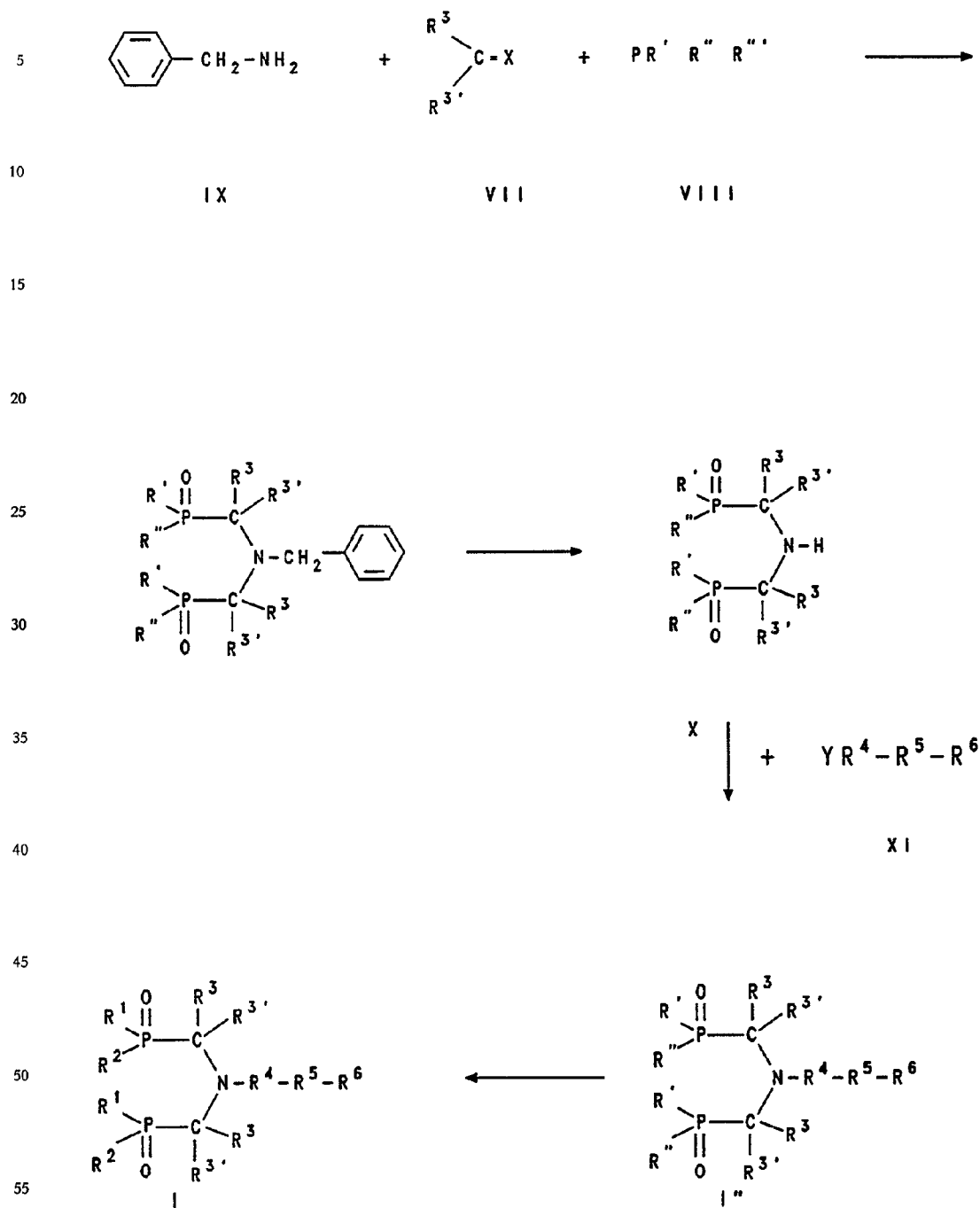
$R'$ ,  $R''$  und  $R'''$  bedeuten Halogen, insbesondere Chlor, Brom, Fluor, Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - bis  $C_4$ -Alkyl, Phenyl oder Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - bis  $C_4$ -Alkyloxy, Phenoxy oder Benzyloxy, unverzweigtes oder verzweigtes  $C_1$ - bis  $C_4$ -Alkylamino, Phenylamino

oder Benzylamino, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Mercaptoalkyl, Thiophenyl oder Mercaptobenzyl. Sofern R' und R'' eine der oben genannten Gruppen bedeutet — außer Hydroxyl, Amino oder Thiol — wird bei der Überführung einer Verbindung der Formel I in eine Verbindung der Formel I R' und R'' entweder verseift, so daß R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> Hydroxyl bedeuten, oder entsprechend den dem Fachmann bekannten Methoden R' und R'' umgesetzt in R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup>, die Amino, Hydroxyl oder Thiol bedeuten. Anschließend werden die Schutzgruppen der Reste R<sup>4'</sup>, R<sup>5'</sup> und R<sup>6'</sup> abgespalten so daß Gruppen R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> entstehen.

b) Ausgehend von Benzylamin der Formel IX werden die Aminodialkylphosphoroxiderivate der Formel I durch Reaktion mit einer Carbonylverbindung der Formel VII und einer Phosphorverbindung der Formel VIII umgesetzt. Das Reaktionsprinzip ist in "Houben—Weyl, Methoden der Organischen Chemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982, S. 130 ff. und S. 302 ff., beschrieben. Nach Abspaltung der Benzylschutzgruppe z. B. durch Hydrierung, wird die Verbindung mit der freien terminalen Aminogruppe der Formel X durch Alkylierung mit einem Halogenid oder Tosylat oder durch reduktive Aminierung mit einer Carbonylverbindung der Formel XI am R<sup>4</sup>-Terminus der Einheit Y—R<sup>4</sup>—R<sup>5</sup>—R<sup>6</sup> verknüpft. Bei der reduktiven Aminierung bildet die Carbonylgruppe mit dem Amin über ein Amid ein Imid. Die Carbonylgruppe wird hierbei in eine Methylengruppe überführt. Die Reaktionsprinzipien sind in "J. March, Advanced Organic Chemistry", 4. Edition, John Wiley & Sons, New York 1992, beschrieben. Nach Abspaltung der verbleibenden Schutzgruppen entsteht die Zielverbindung. Schema II verdeutlicht die Reaktionsfolge.



Schema II



In Schema II haben die Reste R', R'', R''' und R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup> dieselbe Bedeutung wie in Schema I. Y bedeutet hier Halogen, Tosylat oder eine Carbonylgruppe. Auch hier gilt, daß sofern R' und R'' eine der oben genannten Gruppen bedeutet — außer Hydroxyl, Amino oder Thiol — bei der Überführung einer Verbindung der Formel I'' in eine Verbindung der Formel I R' und R'' entweder verseift werden, so daß R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> Hydroxyl bedeuten, oder entsprechend eine dem Fachmann bekannten Methoden R' und R'' in R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> umgesetzt werden, die Amino, Hydroxyl oder Thiol bedeuten.

Bei dem Verfahren zur Herstellung des Konjugates wird schließlich der nichtcyclische Chelatbildner der Formel I, der am Ende der Seitenkette (R<sup>6</sup> in Formel (I)) eine funktionelle Gruppe trägt, mit Hilfe dieser funktionellen Gruppe an die zu markierende Substanz (organspezifische Substanz) gebunden. Die zu markierende Substanz trägt hierzu selbst mindestens eine reaktive Gruppe, insbesondere eine Amino, -Carboxy oder

Thiolgruppe, so daß unter schonenden Bedingungen die Kopplung bzw. die Herstellung des Konjugates durchzuführen ist. Gegebenenfalls nach entsprechender Reinigung des Konjugats (z. B. durch Ultrafiltration oder Dialyse bei Proteinen oder Polymeren, durch Säulenchromatographie bei niedermolekularen Substanzen wie Steroiden oder Lipiden) werden Technetium in Form von Pertechnetat bzw. Rhenium in der Form von Perrhenat und ein geeignetes Reduktionsmittel zur Reduktion des Pertechnetats bzw. Perrhenats in die für die Komplexierung benötigte Oxidationsstufe, in beliebiger Reihenfolge oder gemeinsam zugegeben. Das markierte Substrat wird gegebenenfalls nochmals gereinigt. Alternativ kann auch zunächst der Technetium- bzw. Rheniumkomplex des nichtcyclischen Chelatbildners auf Basis von Aminodialkylphosphoroxiden erzeugt werden und dann dieser mit der Substanz zum Konjugat umgesetzt werden. Hierbei verläuft die Komplexierung und Reduktion wie oben beschrieben. Vorzugsweise wird die Komplexierungsreaktion bei basischem pH (4 bis 10) durchgeführt.

Die Reduktion des Pertechnetats bzw. des Perrhenats kann nach literaturbekannten Verfahren erfolgen, bevorzugt mit einer Zinn-II-Verbindung.

Besonders bevorzugt erfolgt die Reduktion mit einem komplexstabilisierten Zinn-II-Salz, nach einem "Markierungsverfahren", wie dies in der deutschen Offenlegungsschrift DE-A 37 28 599 vorgeschlagen wurde. Dabei wird zunächst die Zinn-II-Verbindung mit einem Komplexbildner, vorzugsweise einer Phosphorverbindung wie einem Phosphonat oder Pyrophosphat oder Citronensäure versetzt, der dafür sorgt, daß die Zinnverbindung vor allem im physiologischen pH-Bereich in Lösung bleibt. Diese komplexstabilisierte Zinn-II-Salz-Lösung kann dann entweder zu der zu markierenden Substanz gegeben werden, worauf die Zugabe der Pertechnetat- bzw. Perrhenat-Lösung erfolgt oder aber zu einer Mischung aus der zu markierenden Substanz und der Pertechnetat- bzw. Perrhenat-Lösung.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Diagnostikum enthaltend einen Chelatkomplex, wie oben definiert, mit Technetium-99m und eine organspezifische Substanz entsprechend obiger Definition.

Darüberhinaus betrifft die vorliegende Erfindung ein Therapeutikum enthaltend einen Chelatkomplex entsprechend obiger Definition mit Rhenium-186 oder -188 und eine organspezifische Substanz, wie oben angegeben.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung einen Testkit zum Nachweis von Tumoren, bestehend aus zwei getrennten, lyophilisierten Komponenten, von denen eine einen Antikörper, der gegen Tumor-assoziierte Antigene gerichtet ist, oder dessen F(ab')<sub>2</sub>-Fragment mit einem nichtcyclischen Chelatbildner auf Basis von Aminodialkylphosphoroxiden der Formel (I) nach Anspruch 1 verknüpft ist, und die andere ein Reduktionsmittel enthält, das zur Reduktion und Bindung des Technetiums an der Antikörperkomponente benötigt wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Zinn-II-Salz als Reduktionsmittel verwendet. Besonders bevorzugt wird dabei das Zinn-II-Salz der Methandiphosphonsäure, Aminomethandiphosphonsäure, 3,3-Diphosphonopropionsäure, 3,3-Diphosphono-1,2-propanedicarbonsäure, Citronensäure oder der Propan-1,1,3,3-tetraphosphonsäure eingesetzt.

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert.

#### 1) Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-glycin

##### Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-glycinmethylester

0,5 g Glycinmethylesterhydrochlorid werden in 100 ml Acetonitril (abs.) suspendiert und nach Zugabe von 3 ml Phosphorigsäurediethylester in Gegenwart von pulverisiertem Molsieb unter Schutzgas zum Rückfluß gebracht. Nach Hinzufügen von 0,9 g Para-Formaldehyd wird bis zur vollständigen Reaktion (ca. 1 h) am Rückfluß erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat eingedunstet. Der Überschuß an Phosphorigsäurediethylester wird an der Ölpumpe bei 50°C abdestilliert. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Essigsäureethylester/Methanol 90 : 10).

Ausbeute: 1,25 g (80%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 4,1 (POCH<sub>2</sub>), 3,3 (PCH<sub>2</sub>), 3,85 (NCH<sub>2</sub>), 3,7 (—CH<sub>3</sub>), 1,3 (POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

##### Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-glycin

1 g Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-glycinmethylester werden in 30 ml konzentrierter Salzsäure ca. 2 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Einengen erhält man 900 mg Rückstand.

Ausbeute: 900 mg (94%).

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): 3,3 (PCH<sub>2</sub>), 3,95 (NCH<sub>2</sub>) ppm.

#### 2) ε-N-Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-lysin

##### ε-N-Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-α-N-carboxybenzyllysinmethylester

992 g α-N-Carboxybenzyllysinmethylesterhydrochlorid werden in 50 ml Acetonitril (abs.) suspendiert und nach Zugabe von 1,66 g Phosphorigsäurediethylester in Gegenwart von pulverisiertem Molsieb unter Schutzgas zum Rückfluß gebracht. Nach Hinzufügen von 1,2 g Para-Formaldehyd wird bis zur vollständigen Reaktion (ca. 3 h) am Rückfluß erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat eingedunstet. Der Überschuß an Phosphorigsäurediethylester wird an der Ölpumpe bei 50°C abdestilliert. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Essigsäureethylester/Methanol 95 : 5).

Ausbeute: 1,5 g (84%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7,4 (Benzyl-H), 5,84 ( $-\text{NH}-$ ), 5,1 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 4,3 ( $-\text{CH}-$ ), 4,1 ( $\text{POCH}_2$ ), 3,1 ( $\text{PCH}_2$ ), 2,78 ( $\text{NCH}_2$ ), 1,9–1,4 ( $-\text{CH}_2-$ ), 1,3 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

#### $\epsilon$ -N-Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-lysine

200 g  $\epsilon$ -N-Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]- $\alpha$ -N-carboxybenzyllysine methylester werden in 10 ml konzentrierter Salzsäure ca. 6 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Einengen erhält man 140 mg Rückstand.  
Ausbeute: 140 mg (97%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,98 ( $-\text{CH}-$ ), 3,4 ( $\text{PCH}_2$ ), 2,0–1,3 ( $-\text{CH}_2-$ ) ppm.

#### 3) Synthese von Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-glycine

##### Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-benzylamin

1,07 g Benzylamin werden in 30 ml Acetonitril (abs.) gelöst und nach Zugabe von 5,5 g Phosphorigsäurediethylester in Gegenwart von pulverisiertem Molsieb unter Schutzgas zum Rückfluß gebracht. Nach Hinzufügen von 1,2 g Para-Formaldehyd wird bis zur vollständigen Reaktion (ca. 1 h) am Rückfluß erhitzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat eingengt. Der Überschuß an Phosphorigsäurediethylester wird an der Ölpumpe bei 50°C abdestilliert. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Essigsäureethylester/ Methanol 90 : 10).

Ausbeute: 1,49 g (37%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 7,2 (Benzyl-H), 4,1 ( $\text{POCH}_2$ ), 3,95 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 3,1 ( $\text{PCH}_2$ ), 1,3 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

##### Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-benzylamin

1 g Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-benzylamin werden mit 30 ml konzentrierter Salzsäure ca. 2 h am Rückfluß erhitzt. Nach dem Einengen wird der Rückstand mit 10 ml Methanol verrührt. Der Niederschlag wird abgesaugt, mit Ammoniumhydroxidlösung alkalisch gestellt und eingengt. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methanol/ Ammoniumhydroxidlösung 90 : 10).

Ausbeute: 300 mg (34%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7,6 (Benzyl-H), 4,7 (Benzyl- $\text{CH}_2$ ), 3,55–3,35 ( $\text{PCH}_2$ ) ppm.

##### Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-amin

300 mg Di-[N-methyl-(phosphonyl)]-benzylamin werden in 5 ml Methanol gelöst und mit Palladiumhydroxid auf Aktivkohle in einer Wasserstoffatmosphäre hydriert. Nach 4 Stunden wird der Palladiumkatalysator abfiltriert und die Lösung eingengt.

Ausbeute: 210 mg (95%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,61–3,40 ( $\text{PCH}_2$ ) ppm.

##### Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-glycine

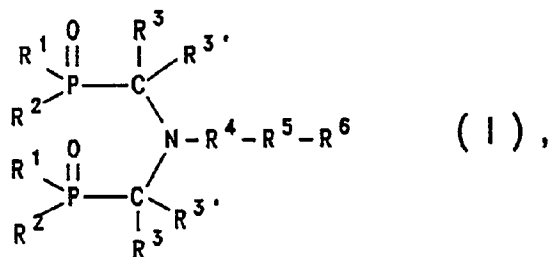
210 mg Di-[N-methyl-(diethylphosphonyl)]-amin werden in flüssigem Ammoniak gelöst, mit 234 mg Natriumamid und 416 mg Iodessigsäure-Natriumsalz versetzt. Nach 8 h wird mit Ammoniumchlorid neutralisiert, der Ammoniak verdampft. Der Rückstand wird an Kieselgel chromatographiert (Eluent: Methanol/Ammoniumhydroxidlösung 100 : 0–1:1).

Ausbeute: 193 mg (72%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3,3 ( $\text{PCH}_2$ ), 3,95 ( $\text{NCH}_2$ ) ppm.

#### Patentansprüche

##### 1. Substituierte Aminodialkylphosphonsäuren der Formel (I)

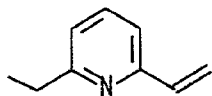


worin

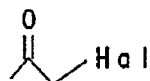
$\text{R}^1$  Hydroxyl, Amino oder Thiol,

$\text{R}^2$  Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes  $\text{C}_1$ - bis  $\text{C}_4$ -Alkyl, Phenyl oder

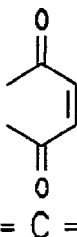
Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyloxy, Phenyloxy oder Benzyloxy, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkylamino, Phenylamino oder Benzylamino, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Mercaptoalkyl, Thiophenyl oder Mercaptobenzyl sind,  
 R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup> gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl, sind,  
 R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>6</sub>-Alkylen oder ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-Aralkylen,  
 R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, Thiol, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist und  
 R<sup>6</sup> -COOH, sofern R<sup>5</sup> -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino, Hydroxy oder Thio bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln IV oder V, sofern R<sup>5</sup> Amino bedeutet,



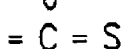
( I I )



( I I I )



( I V )



( V )

oder -N<sub>3</sub>-, -Hal oder -SH ist, wobei Hal für Fluor, Chlor, Brom oder Jod steht und  
 R<sup>7</sup> die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

2. Verbindungen gemäß Formel (I) nach Anspruch 1, worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol

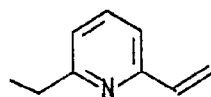
R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyl, Phenyl oder Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>4</sub>-Alkyloxy, Phenyloxy oder Benzyloxy sind,

R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup>, Wasserstoff oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl ist,

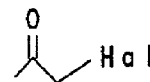
R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>6</sub>-Alkylen oder ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-Aralkylen ist,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, Thiol, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist und

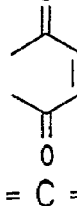
R<sup>6</sup> -COOH, sofern R<sup>5</sup> -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino, Hydroxy oder Thio bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln IV oder V, sofern R<sup>5</sup> Amino bedeutet,



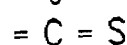
( I I )



( I I I )



( I V )



( V )

oder -N<sub>3</sub>-, -Hal oder -SH ist, wobei Hal für Chlor, Brom oder Jod steht und

R<sup>7</sup> die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

3. Verbindungen gemäß Formel (I) nach den Ansprüchen 1 oder 2, worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol

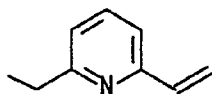
R<sup>2</sup> Wasserstoff, Hydroxyl, Amino, Thiol, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>3</sub>-Alkyl, Phenyl oder Benzyl, unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>3</sub>-Alkyloxy, Phenylloxy oder Benzyloxy sind,

R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup>, Wasserstoff oder (C<sub>1</sub> - C<sub>2</sub>)-Alkyl ist,

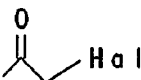
R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>5</sub>-Alkylen, ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>-Aralkylen ist,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, Thiol, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist,

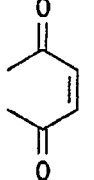
R<sup>6</sup> -COOH, sofern R<sup>5</sup> -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino-, Hydroxy- oder Thiogruppe bedeutet, oder eine Gruppe der Formeln IV oder V, sofern R<sup>5</sup> Amino bedeutet,



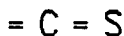
( I I )



( I I I )



( I V )



( V )

oder Hal bedeutet, wobei Hal für Chlor, Brom oder Jod steht und

R<sup>7</sup> die Seitenkette einer Aminosäure ist.

4. Verbindungen gemäß Formel (I) nach den Ansprüchen 1 bis 3, worin

R<sup>1</sup> Hydroxyl, Amino oder Thiol,

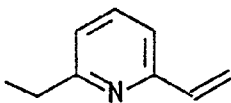
R<sup>2</sup> Hydroxyl, Amino oder unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>1</sub>- bis C<sub>2</sub>-Alkyl- sind,

R<sup>3</sup> und R<sup>3'</sup>, Wasserstoff ist,

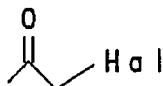
R<sup>4</sup> unverzweigtes oder verzweigtes C<sub>0</sub>- bis C<sub>5</sub>-Alkylen, ortho-, meta- oder para-C<sub>7</sub>-C<sub>12</sub>-Aralkylen ist,

R<sup>5</sup> Amino, Hydroxyl, eine Ester- oder eine Amidgruppe, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- ist und

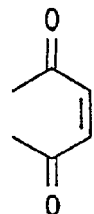
R<sup>6</sup> -COOH, sofern R<sup>5</sup> -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- oder -CH(OH)- bedeutet oder eine Gruppe der Formeln II oder III, sofern R<sup>5</sup> Amino- oder Hydroxygruppe bedeutet oder eine Gruppe der Formeln IV, sofern R<sup>5</sup> Aminogruppe bedeutet,



( I I )



( I I I )



( I V )

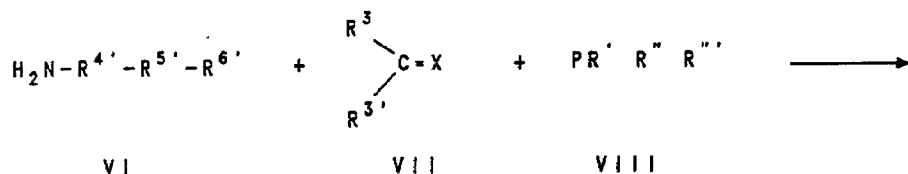
oder Hal, wobei Hal für Chlor, Brom oder Jod steht und

R<sup>7</sup> die Seitenkette einer proteinogenen Aminosäure ist.

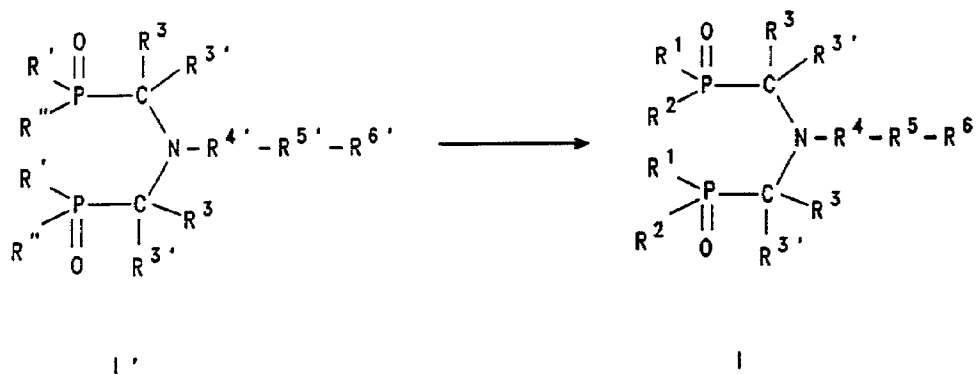
5. Chelatkomplex, enthaltend eine oder zwei Verbindungen der Formel I gemäß den Ansprüchen 1 bis 4 und mindestens ein Technetium- oder Rheniumion.

6. Konjugat, enthaltend einen Chelatkomplex gemäß Anspruch 5 und eine organspezifische Substanz, die über R<sup>6</sup> einer Verbindung gemäß Formel I gebunden ist.

7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel I nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungen der Formeln VI, VII und VIII zu einer Verbindung der Formel I' umgesetzt werden,



und diese wiederum unter Abspaltung der Schutzgruppen an R<sup>4'</sup>, R<sup>5'</sup>, und R<sup>6'</sup>, in eine Verbindung der Formel I übergeführt wird,



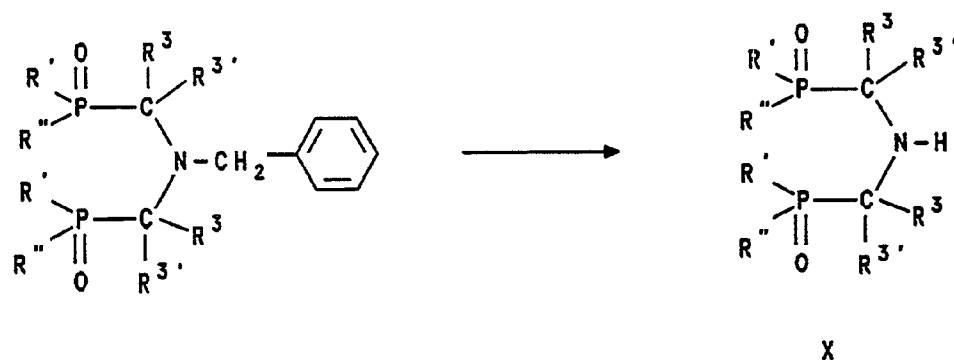
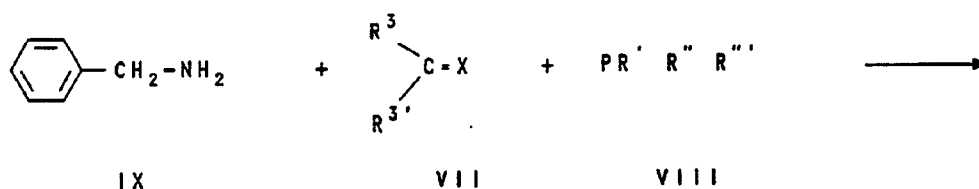
wobei

R<sup>4'</sup>, R<sup>5'</sup> und R<sup>6'</sup> die mit Schutzgruppen versehenen Gruppen R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> und R<sup>6</sup>,

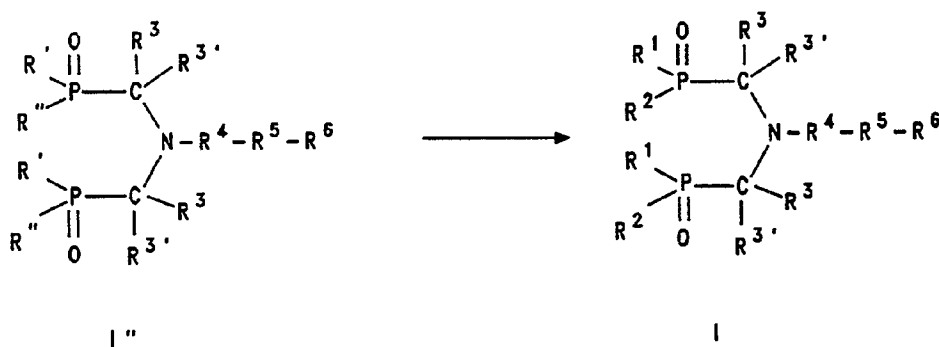
X Sauerstoff oder Stickstoff und

R', R'' und R''' Halogen, insbesondere Chlor, Brom, Fluor oder ein Rest, der für R<sup>2</sup> gilt, bedeutet.

8. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der allgemeinen Formel I nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß Verbindungen der Formeln IX, VII und VIII unter Abspaltung der Benzylschutzgruppe in eine Verbindung der Formel X umgesetzt werden,



und diese mit  $\text{Y-R}^4\text{-R}^5\text{-R}^6$  (XI) über eine Verbindung der Formel I'' in eine Verbindung der Formel I übergeführt wird,



wobei

$\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  und  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  und  $\text{R}^6$  wie in Anspruch 7 definiert gelten und

$\text{Y}$  Halogen oder Tosylat bedeutet, sowie eine Carbonylgruppe, die nach Kopplung mit dem Amin über das gebildete Imin in eine Methylengruppe übergeführt wird.

9. Diagnostikum enthaltend eine Verbindung gemäß Anspruch 5 und eine organspezifische Substanz.

10. Therapeutikum enthaltend eine Verbindung gemäß Anspruch 5 und eine organspezifische Substanz.

11. Testkit zum Nachweis von Tumoren, enthaltend räumlich getrennt voneinander eine an eine organspezifische Substanz gebundene Verbindung gemäß Anspruch 4 und ein Reduktionsmittel, das zur Reduktion des Technetiums vom Pertechnetat in Technetium (II) befähigt ist, enthält.

OPIC  
OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ  
INTELLECTUELLE DU CANADA



CIPO  
CANADIAN INTELLECTUAL  
PROPERTY OFFICE

Ottawa Hull K1A 0C9

(21) (A1)	2,144,588
(22)	1995/03/14
(43)	1995/09/16

(51) Int.Cl. <sup>6</sup> C07F 9/38; C07F 9/58; C07F 13/00; C07K 1/13; A61K 51/00

(19) (CA) **APPLICATION FOR CANADIAN PATENT** (12)

(54) **Acyclic Chelating Agents Based on Aminodialkylphosphoric Oxides for the Preparation of Technetium or Rhenium Complexes**

(72) Stahl, Wilhelm - Germany (Federal Republic of) ;  
Walch, Axel - Germany (Federal Republic of) ;  
Doll, Wilfried - Germany (Federal Republic of) ;  
Kuhlmann, Ludwig - Germany (Federal Republic of) ;  
Pütter, Dietrich - Germany (Federal Republic of) ;

(71) Hoechst Aktiengesellschaft - Germany (Federal Republic of) ;

(30) (DE) P 44 08 729.2 1994/03/15

(57) 11 Claims

Notice: This application is as filed and may therefore contain an incomplete specification.



Industrie Canada Industry Canada

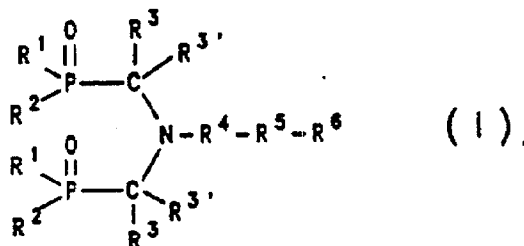
Canada



## Abstract

Acyclic chelating agents based on aminodialkylphosphoric oxides for the preparation of technetium or rhenium complexes

- 5 The invention relates to acyclic chelating agents based on aminodialkylphosphoric oxides of the formula (I)



- The compounds according to the invention are used for the labeling of substances, in particular with radioactive technetium or rhenium isotopes. These compounds are also
- 10 used as a diagnostic or therapeutic, and in the form of a test kit for the detection of tumors.

## Description

Acyclic chelating agents based on aminodialkylphosphoric  
oxides for the preparation of technetium or rhenium  
5 complexes

The invention relates to acyclic chelating agents based  
on aminodialkylphosphoric oxides, their use for the  
labeling of substances, in particular with radioactive  
technetium or rhenium isotopes, and the use of the  
10 chelates in diagnostic and therapeutic processes.

In the past, the demand to label chemical compounds with  
radioactive nuclides grew. Especially in the field of  
medical diagnosis, where pathological conditions can  
already be indicated by substances which occur in the  
15 body only in ppm or even in still lower concentrations,  
radiolabeled substances can today no longer be dispensed  
with.

Technetium-99m, in particular, because of its favorable  
physical properties (absence of a corpuscular radiation,  
20  $\gamma$  energy of 140 keV and half-life of 6 hours) and the low  
radiation burden associated therewith has become the most  
important radionuclide in nuclear medical diagnosis.

Technetium-99m, which can be obtained from nuclide  
generators, is initially present as pertechnetate, which  
25 is suitable in this form, e.g. for thyroid and brain  
scintigraphy. The scintigraphy of other organs by means  
of technetium-99m is carried out with the aid of specific  
"transport substances" which on the one hand are able to  
bind technetium and on the other hand to enrich the  
30 radionuclide in the target organ with high selectivity.  
To label the organ-specific transport substance with  
technetium-99m, the pertechnetate eluted from the nuclide  
generator must first be converted to a lower oxidation  
state. In this reduced form, technetium forms compounds  
35 which are stable to a greater or lesser extent with the

organ-specific substance. For bone scintigraphy, e.g. Tc-99m-phosphoric acid derivatives, especially organic phosphonic acids, are employed. Thus in the labeling unit described in European Patent 002485 the sodium salt of  
5 3,3-diphosphono-1,2-propanedicarboxylic acid is present as the organ-specific transport substance. European Patent 108253 describes Tc-99m tri- and tetraphosphonic acids for the scintigraphic demonstration of the reticuloendothelial system (RES), in particular of the  
10 liver. The Tc-99m complex with diethylenetriaminepenta-acetic acid (DTPA) is used for the diagnosis of kidney disorders or pathological brain processes.

To label specific substances with technetium-99m and to prepare test kits suitable for routine clinical needs,  
15 special processes were developed and described. To prepare labeling kits for macromolecules of biological interest, in particular porphyrins, dextrans, cytochromes and myoglobin, a method is described (G.D. Zanelli, D. Ellison, M.P. Barrowcliffe, Nucl. Med. Commun. 8, 199  
20 to 206, 1987) in which the substance to be labeled is lyophilized together with p-aminobenzoic acid and a hydrochloric acid solution of  $\text{SnCl}_2$ . To reconstitute and label this kit, Tc-99m generator eluate which has previously been diluted with sufficient buffer solution,  
25 e.g. citrate/sodium chloride buffer pH 9.5, is added. This method is not suitable, however, for acid-sensitive substances.

In another process (E.K.J. Pauweis, R.I.J. Feitsma, International Patent Application WO 86/03010), Tc-99m  
30 pertechnetate is first reduced by heating to 140°C for four hours in strong hydrochloric acid solution and bound to a compound which contains an amino group, e.g. dimethylformamide. The reactive Tc-99m-labeled intermediate, which precipitates as a sparingly soluble  
35 crystalline substance, is reacted in a buffer solution, e.g. sodium carbonate solution, by incubation for one hour at room temperature with the compound to be labeled.

The method does work in the absence of tin, but because of the complicated process steps is hardly suitable for routine use.

5 To label proteins, in particular antibodies, two different routes are known. In the direct method the reduced technetium-99m is bound by donor groups (amino, amide, thiol, etc.) of the protein.

Such processes are described in European Patent 005638 and US Patent 4,478,815. Tin(II) salts are used there in  
10 excess for the simultaneous reductive cleavage of disulfide bridges and for the reduction of the Tc-99m pertechnetate added. In general, longer incubation times (24 hours) are needed for the cleavage of the -S-S- bond, F(ab')<sub>2</sub> fragments being partially cleaved to give Fab'  
15 fragments. More recent literature references (e.g. Journal of Nuclear Medicine 27 (1986), pages 685 to 693 and 1315 to 1320, and International Journal of Nuclear Medicine Biology 12 (1985) pages 3 to 8) show that the ratio of the two fragments is dependent on the "tinning  
20 reaction" and that the ratio of the two components after Tc-99m labeling no longer changes to a noticeable extent, the main component being Tc-99m-labeled F(ab'). In all cases, the labeled F(ab') fragment had to be repurified, as despite a reaction time of at least 30 minutes a  
25 quantitative reaction of the pertechnetate was not achieved.

In a rapid chemical method for the Tc-99m labeling of human plasma proteins (D.W. Wong, F. Mishkin, T. Lee, J. Nucl. Med. 20, 967 to 972, 1979), pertechnetate is first  
30 reduced in acidic solution by tin(II) ions and the reduced technetium is then reacted with the protein.

With the aid of bifunctional complexing agents, a stable labeling of substances with radioisotopes can be achieved. In US Patent 4,479,930, the cyclic anhydrides  
35 of DTPA and EDTA are indicated as chelating agents not

- 4 -

only for In-111 and Ga-67, but also for Tc-99m. In European Patent 35765, the use of deferoxamine as a complexing agent for technetium-99m to proteins is mentioned. In International Patent Application WO 85/3063, the partially reduced disulfide bridges in the antibody are reacted with the sodium salt of tetrachloro-nitridotechnetate, which has to be prepared beforehand by reaction of pertechnetate with sodium azide. In European Patent Application 194853, free thiol groups likewise produced by reduction in antibody fragments are used for the binding of [(7-maleimidoheptyl)iminobis(ethylene-nitrilo)]tetraacetic acid as a chelate complex. The coupling of the complex to the antibody is carried out via the reaction of the SH groups with the double bond in the maleimide moiety of the complex compound, while the radioactive metal ion is complexed via the nitrilodiacetic acid radicals.

Metallothionein, a metal-binding protein having a molecular weight of 6000 and a high cysteine content in the molecule was introduced into antibodies as a complexing agent (G.L. Toman, R.J. Hadjian, M.M. Morelock et al., J. Nucl. Med. 25, 20, 1984). By means of exchange with Tc-99m glucoheptonate, it was possible to label the antibody-metallothionein conjugate with technetium. The exchange, however, remained incomplete, so that a subsequent purification was necessary. Several bithiosemicarbazone ligands were likewise described as bifunctional chelating agents (Y. Arano, A. Yokoyama, H. Magat et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 12, 425 to 430, 1986). p-Carboxyethylphenylglyoxal di(N-methylthiosemicarbazone) was conjugated with human serum albumin. The Tc-99m-labeled 1:1 complex showed a certain instability, while complexes having a higher ratio than 1:1 had an increased liver storage. The coupling of a diamide-dimercaptide- $N_2S_2$  ligand to proteins (A.R. Fritzberg, S. Kasina, J.M. Reno et al., J. Nucl. Med. 27, 957 to 958, 1986) is carried out via an additional function group. Thus, e.g. 4,5-di(S-ethylcarbonylmercaptoacetamide)pentanoyl-N-

hydroxysuccinimide was reacted with an anti-melanoma antibody. The resultant conjugate was incubated at pH 8 and 50°C with Tc-99m tartrate solution. After one hour, 78% of the technetium were transferred from the tartrate to the antibody.

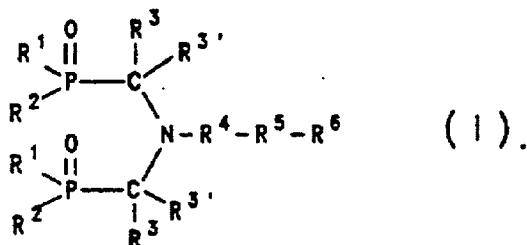
In order to be able to use technetium-99m widely in diagnosis, it is necessary to transport this nuclide selectively into the organ to be examined. The technetium-99m should be rapidly eliminated again from other organs or organ systems or not taken there at all in order to avoid any unnecessary radiation burden for the patient. For this purpose, until now substances have mainly been employed which can be labeled directly with technetium-99m and have a high organ specificity. Moreover, there are, however, a number of substances which do have a high organ specificity, but cannot be directly labeled. These can be proteins (fibrinogen, human serum albumin), monoclonal antibodies, antibody fragments, diagnostic peptides (amidinophenylalanine derivatives; EP 0508220, EP 0513543), enzymes (streptokinase, lactate dehydrogenase), sugars (dextran, glucose) or even polymers. Low-molecular weight substances such as, for example, fatty acids are likewise included therein, which as a result of the high energy requirement of the heart concentrate in the myocardial tissue. In order to be able to label these substances, they are coupled with complexing agents which for their part can firmly bind technetium-99m.

Macrocyclic amines, inter alia also cyclams, are known as suitable complexing agents for the complexation of metal ions. The complexation yield for the technetium-cyclam complex under suitable conditions is 99%. Details of technetium-amine complexes are mentioned in D.E. Troutner, J. Simon, A.R. Ketrin, W.A. Volkert, R.A. Holmes, J. Nucl. Med. 21 (1980), 443 or S.A. Zuckmann, G.M. Freeman, D.E. Troutner, W.A. Volkert, R.A. Holmes, D.G. van der Keer, E.K. Barefiled, Inorg.

- Ch. 20 (1981), 3386 or J. Simon, D. Troutner, W.A. Volkert, R.A. Holmes, Radiochem. Radioanal. Lett. 47 (1981), 111. Substituted cyclams, substituted both on the 1-nitrogen and the 6-carbon, are also known (A.R. Ketrin, D.E. Troutner et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 11 (1984), 113 or J. Simon. Diss. Abstr. Int. B42 (1981), 645 or M. Struden, T.A. Kaden, Helv. Chim. Acta 69 (1986), 2081 or E. Kimura, R. Machida, M. Kodama, J. Am. Chem. Soc. 106 (1984), 5497).
- 10 A number of attempts to conjugate amines and also other ligands to proteins (see Fritzberg et al., J. Nucl. Med. 27 (1986), 957 or Tolman et al., J. Nucl. Med. 25 (1984), 20 or Arano et al., Int. J. Nucl. Med. Biol. 12 (1986) 425) led to products which did not fulfil or only partially fulfilled the high in vivo stability demands.

The present invention was therefore based on the object of making available suitable chelating agents for the preparation of extremely stable, in particular radioactive, technetium and rhenium complexes, which can be prepared in a simple manner and can be employed for the labeling of substances.

This object was surprisingly achieved using substituted aminodialkylphosphonic acids of the formula (I)



wherein

- 25  $\text{R}^1$  is hydroxyl, amino or thiol,  
 $\text{R}^2$  is hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -alkyl, phenyl or benzyl,

- 7 -

unbranched or branched C<sub>1</sub>- to C<sub>4</sub>-alkoxy, phenoxy or benzyloxy, unbranched or branched C<sub>1</sub>- to C<sub>4</sub>-alkyl-amino, phenylamino or benzylamino, unbranched or branched C<sub>1</sub>- to C<sub>4</sub>-mercaptoalkyl, thiophenyl or mercaptobenzyl,

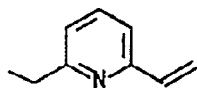
R<sup>3</sup> and R<sup>3'</sup> are identical or different and are hydrogen or (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-alkyl,

R<sup>4</sup> is unbranched or branched C<sub>0</sub>- to C<sub>6</sub>-alkylene or ortho-, meta-, or para-C<sub>7</sub>-C<sub>15</sub>-aralkylene,

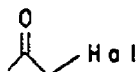
R<sup>5</sup> is amino, hydroxyl, thiol, an ester or an amide group, -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- or -CH(OH)-

and

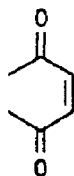
R<sup>6</sup> is -COOH if R<sup>5</sup> is -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- or -CH(OH)-, or a group of the formula II or III if R<sup>5</sup> is amino, hydroxyl or thio, or a group of the formula IV or V if R<sup>5</sup> is amino,



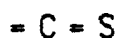
(II)



(III)



(IV)



(V)

or is -N<sub>3</sub>-, -Hal or -SH, Hal being fluorine, chlorine, bromine or iodine and

R<sup>7</sup> is the side chain of a proteinogenic amino acid.

In particular, the invention relates to compounds according to formula (I),

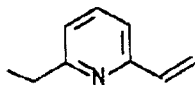
wherein

R<sup>1</sup> is hydroxyl, amino or thiol,

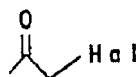


- 8 -

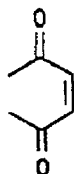
- $R^2$  is hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_4$ -alkyl, phenyl or benzyl, unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_4$ -alkoxy, phenoxy or benzyloxy,
- 5  $R^3$  and  $R^{3'}$  are hydrogen or  $(C_1-C_4)$ -alkyl,
- $R^4$  is unbranched or branched  $C_0$ - to  $C_6$ -alkylene or ortho-, meta- or para- $C_7-C_{15}$ -aralkylene,
- $R^5$  is amino, hydroxyl, thiol, an ester or an amide group,  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$
- 10 and
- $R^6$  is  $-COOH$  if  $R^5$  is  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$ , or a group of the formula II or III if  $R^5$  is amino, hydroxyl or thio, or a group of the formula IV or V if  $R^5$  is amino,



(II)



(III)



(IV)



(V)

- 15 or is  $-N_3$ ,  $-Hal$  or  $-SH$ , Hal being chlorine, bromine or iodine and
- $R^7$  is the side chain of a proteinogenic amino acid.

Preferred compounds according to the formula (I) are those

20 wherein

- $R^1$  is hydroxyl, amino or thiol,
- $R^2$  is hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_3$ -alkyl, phenyl or benzyl,

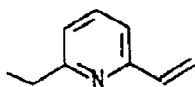
unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_3$ -alkoxy, phenoxy or benzyloxy,

$R^3$  and  $R^{3'}$  are hydrogen or  $(C_1-C_2)$ -alkyl,

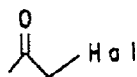
$R^4$  is unbranched or branched  $C_0$ - to  $C_5$ -alkylene, ortho-, meta- or para- $C_7-C_{12}$ -aralkylene,

5  $R^5$  is amino, hydroxyl, thiol, an ester or an amide group,  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$ ,

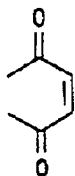
10  $R^6$  is  $-COOH$  if  $R^5$  is  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$ , or is a group of the formula II or III if  $R^5$  is amino, hydroxyl or thio, or a group of the formula IV or V if  $R^5$  is amino,



(II)



(III)



(IV)



(V)

or is Hal, Hal being chlorine, bromine or iodine and  $R^7$  is the side chain of a proteinogenic amino acid.

15 Very particularly preferred compounds according to formula (I) are finally those wherein

$R^1$  is hydroxyl, amino or thiol,

$R^2$  is hydroxyl, amino or unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_2$ -alkyl,

20  $R^3$  and  $R^{3'}$  are hydrogen,

$R^4$  is unbranched or branched  $C_0$ - to  $C_5$ -alkylene, ortho-, meta- or para- $C_7-C_{12}$ -aralkylene,

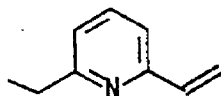
$R^5$  is amino, hydroxyl, an ester or an amide group,

- 10 -

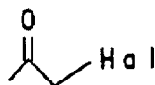
-CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- or -CH(OH)-

and

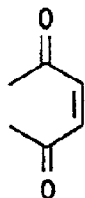
R<sup>6</sup> is -COOH if R<sup>5</sup> is -CH<sub>2</sub>-, -CH(R<sup>7</sup>)-, -CH(NH<sub>2</sub>)- or -CH(OH)- or a group of the formula II or III if R<sup>5</sup> is amino or hydroxyl or a group of the formula IV if R<sup>5</sup> is amino,



(II)



(III)



(IV)

or Hal, Hal being chlorine, bromine or iodine and R<sup>7</sup> is the side chain of a proteinogenic amino acid.

Proteinogenic amino acid is understood as meaning a natural amino acid, in particular an L-amino acid.

The present invention furthermore relates to a chelate complex containing one or two compounds of the formula (I) and at least one technetium or rhenium ion. Chelate complexes containing a technetium or rhenium ion are preferred.

The present invention furthermore relates to a conjugate containing a compound according to formula I and, bonded via the side chain R<sup>6</sup>, a "substance of diagnostic and/or therapeutic interest". "Substances of diagnostic and/or therapeutic interest" are primarily understood as meaning those compounds which can be employed in medical diagnosis as "transport substances", i.e. usually organ-specific substances, such as antibodies, antibody

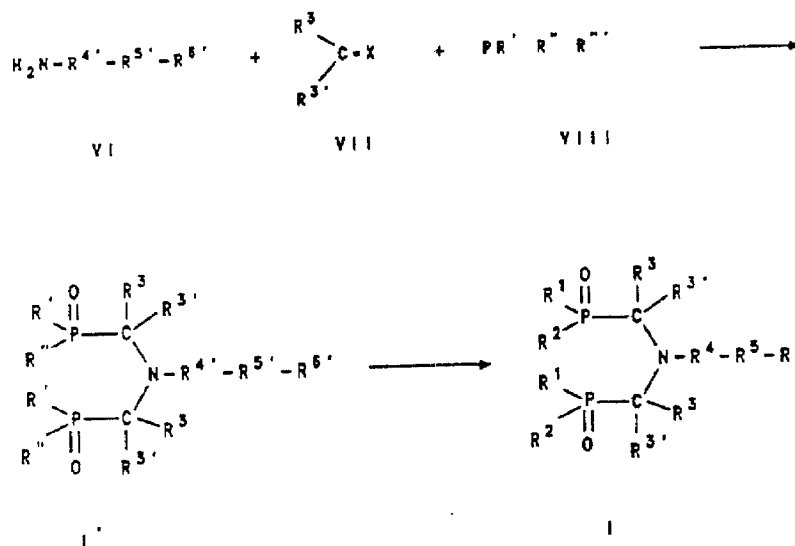
fragments [e.g.  $F(ab')_2$  or  $Fab'$  fragments], proteins (e.g. fibrinogen), peptides (e.g. somatostatin), oligonucleotides, sugars (e.g. dextran, glucose) or even polymers. On the other hand, however, those substances  
5 can also generally be labeled with the acyclic chelating agents according to the invention or chelate complexes prepared therefrom, which with their functional group in the side chain react with the formation of a chemical bond. Intended here is e.g. the "monitoring" of chemical  
10 substances in production plants, the determination of their concentration, flow rate and residence time.

The preparation of the chelating agents according to the invention, based on aminodialkylphosphoric oxides, is carried out by two different routes.

- 15 a) Starting from compounds having a free terminal amino group of the formula VI, e.g. commercially available amino acids, all functional groups present, apart from the amino group, are blocked with protective groups as disclosed in the literature (Protective Groups in Organic  
20 Synthesis, Second Edition, T.W. Greene, P.G.M. Wuts, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991). The amino group which is then free can be converted, e.g. for the preparation of the aminodialkylphosphoric oxide derivatives, by reaction of a carbonyl compound of the  
25 formula VII and of a phosphorus compound of the formula VIII. The reaction principle is described in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie (Methods of organic chemistry), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982, E2, pp. 130 ff. and p. 302 ff. After removal of the  
30 protective groups a compound of the formula I results.

Scheme I illustrates the reaction sequence.

Scheme I

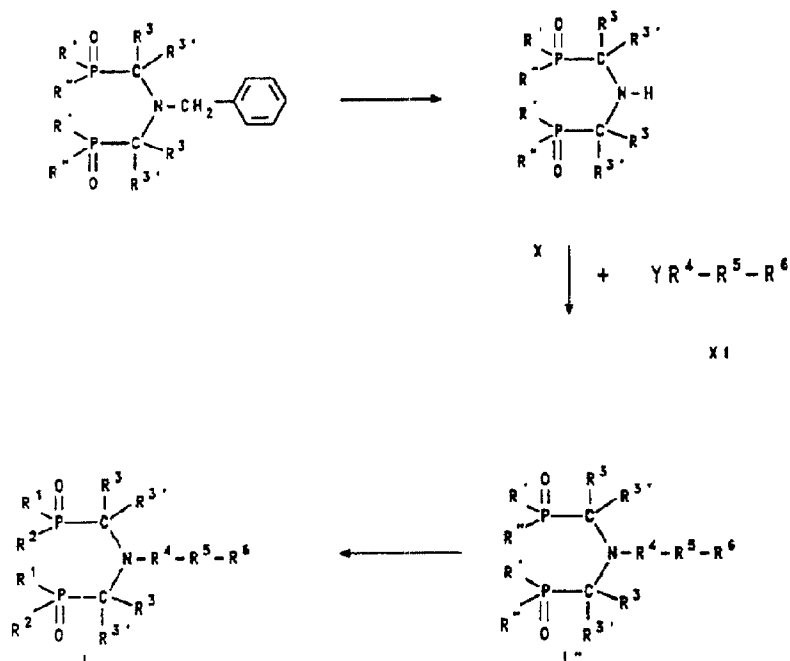
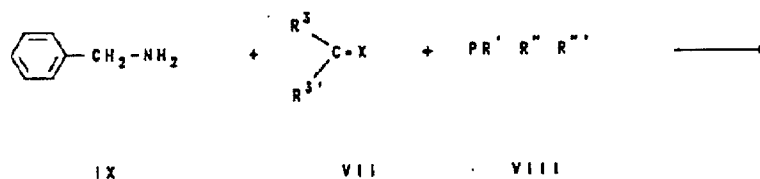


In Scheme I,  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^{5'}$  and  $\text{R}^{6'}$  are the groups  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  and  $\text{R}^6$  provided with protective groups if  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  or  $\text{R}^6$  is a group which can and must be protected. X is oxygen or nitrogen which is substituted by the nitrogen or the phosphorus of the compounds of the formulae VI and VIII.

$\text{R}'$ ,  $\text{R}''$  and  $\text{R}'''$  are halogen, in particular chlorine, bromine, fluorine, hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -alkyl, phenyl or benzyl, unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -alkoxy, phenoxy or benzyloxy, unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -alkylamino, phenylamino or benzylamino, unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -mercaptoalkyl, thiophenyl or mercaptobenzyl. If  $\text{R}'$  and  $\text{R}''$  are one of the abovementioned groups - apart from hydroxyl, amino or thiol - in the conversion of a compound of the formula I' to a compound of the formula I  $\text{R}'$  and  $\text{R}''$  are either hydrolyzed such that  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$  are hydroxyl, or  $\text{R}'$  and  $\text{R}''$  are converted to  $\text{R}^1$  and  $\text{R}^2$ , which are amino, hydroxyl or thiol, according to methods known to the person skilled in the art. The protective groups of the radicals  $\text{R}^{4'}$ ,  $\text{R}^{5'}$  and  $\text{R}^{6'}$  are then removed such that groups  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  and  $\text{R}^6$  are formed.

b) Starting from benzylamine of the formula IX, the aminodialkylphosphoric oxide derivatives of the formula I are prepared by reaction with a carbonyl compound of the formula VII and of a phosphorus compound of the formula VIII. The reaction principle is described in "Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie" (Methods of Organic Chemistry), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1982, p. 130 ff. and p. 302 ff. After removal of the benzyl protective group, e.g. by hydrogenation, the compound with the free terminal amino group of the formula X is linked to the  $R^4$  terminus of the unit  $Y-R^4-R^5-R^6$  by alkylation with a halide or tosylate or by reductive amination with a carbonyl compound of the formula XI. During the reductive amination, the carbonyl group forms an imide with the amine via an amide. The carbonyl group is converted in this process to a methylene group. The reaction principles are described in "J. March, Advanced Organic Chemistry", 4th edition, John Wiley & Sons, New York 1992. After removal of the remaining protective groups the target compound is formed. Scheme II illustrates the reaction sequence.

Scheme II



In Scheme II, the radicals  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  and  $R^4$ ,  $R^5$  and  $R^6$  have the same meaning as in Scheme I. Y here is halogen, tosylate or a carbonyl group. It also applies here that

5 if  $R^1$  and  $R^2$  denote one of the abovementioned groups - apart from hydroxyl, amino or thiol - during the conversion of a compound of the formula I' to a compound of the formula I,  $R^1$  and  $R^2$  are either hydrolyzed such that

10  $R^1$  and  $R^2$  are hydroxyl, or  $R^1$  and  $R^2$  are converted into  $R^1$  and  $R^2$ , which are amino, hydroxyl or thiol, according to a method known to the person skilled in the art.

In the process for the preparation of the conjugate, the acyclic chelating agent of the formula I, which carries a functional group at the end of the side chain ( $R^6$  in formula (I)), is finally bound with the aid of this functional group to the substance to be labeled (organ-specific substance). The substance to be labeled for this purpose itself carries at least one reactive group, in particular an amino, carboxyl or thiol group, such that the coupling or the preparation of the conjugate is to be carried out under gentle conditions. Optionally after appropriate purification of the conjugate (e.g. by ultrafiltration or dialysis in the case of proteins or polymers, by column chromatography in the case of low-molecular weight substances such as steroids or lipids), technetium in the form of pertechnetate or rhenium in the form of perrhenate and a suitable reductant for the reduction of the pertechnetate or perrhenate to the oxidation state required for complexation are added in any desired sequence or together. The labeled substrate is optionally purified again. Alternatively, the technetium or rhenium complex of the acyclic chelating agent based on aminodialkylphosphoric oxides can also be produced first and this can then be reacted with the substance to give the conjugate. In this case, the complexation and reduction proceeds as described above. Preferably the complexation reaction is carried out at basic pH (4 to 10).

The reduction of the pertechnetate or of the perrhenate can be carried out by processes known from the literature, preferably using a tin(II) compound.

Particularly preferably, the reduction is carried out with a complex-stabilized tin(II) salt, by a "labeling process" as has been proposed in German Offenlegungsschrift DE-A 3728599. In this process the tin(II) compound is first treated with a complexing agent, preferably a phosphorus compound such as a phosphonate or pyrophosphate or citric acid which makes sure that the



- 16 -

tin compound remains in solution, especially in the physiological pH range. This complex-stabilized tin(II) salt solution can then be added either to the substance to be labeled, after which the addition of the pertechnate or perrhenate solution is carried out, or else to a mixture of the substance to be labeled and the pertechnetate or perrhenate solution.

The present invention furthermore relates to a diagnostic containing a chelate complex, as defined above, with technetium-99m and an organ-specific substance corresponding to the above definition.

Moreover, the present invention relates to a therapeutic containing a chelate complex corresponding to the above definition with rhenium-186 or -188 and an organ-specific substance, as indicated above.

The present invention further relates to a test kit for the determination of tumors, comprising two separate, lyophilized components, of which one contains an antibody which is directed against tumor-associated antigens, or whose  $F(ab')_2$  fragment is linked with an acyclic chelating agent based on aminodialkylphosphoric oxides of the formula (I) as claimed in claim 1, and the other contains a reductant which is required for the reduction and binding of the technetium to the antibody component.

In a preferred embodiment, a tin(II) salt is used as the reductant. The tin(II) salt of methanediphosphonic acid, aminomethanediphosphonic acid, 3,3-diphosphonopropionic acid, 3,3-diphosphono-1,2-propanedicarboxylic acid, citric acid or propane-1,1,3,3-tetraphosphonic acid is particularly preferably employed in this case.

In the following, the invention is illustrated in greater detail with the aid of examples.

## 1) Di[N-methyl(phosphonyl)]glycine

## Di[N-methyl(diethylphosphonyl)]glycine methyl ester

0.5 g of glycine methyl ester hydrochloride is suspended in 100 ml of acetonitrile (abs.) and, after addition of 3 ml of diethyl phosphite, the mixture is brought to reflux under protective gas in the presence of pulverized molecular sieve. After adding 0.9 g of paraformaldehyde the mixture is heated at reflux until reaction is complete (about 1 h). The precipitate is filtered off and the filtrate is concentrated. The excess of diethyl phosphite is distilled off at 50°C on an oil pump. The residue is chromatographed on silica gel (eluent: ethyl acetate/methanol 90:10).

Yield: 1.25 g (80%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ): 4.1 ( $\text{POCH}_2$ ), 3.3 ( $\text{PCH}_2$ ), 3.85 ( $\text{NCH}_2$ ) 3.7 ( $-\text{CH}_3$ ), 1.3 ( $\text{POCH}_2\text{CH}_3$ ) ppm.

## Di[N-methyl(phosphonyl)]glycine

1 g of di[N-methyl(diethylphosphonyl)]glycine methyl ester is heated to reflux for about 2 h in 30 ml of concentrated hydrochloric acid. After concentrating, 900 mg of residue are obtained.

Yield: 900 mg (94%)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3.3 ( $\text{PCH}_2$ ), 3.95 ( $\text{NCH}_2$ ) ppm.

2)  $\epsilon$ -N-Di[N-methyl(phosphonyl)]lysine

$\epsilon$ -N-Di[N-methyl(diethylphosphonyl)]- $\alpha$ -N-carboxybenzyllysine methyl ester

992 g of  $\alpha$ -N-carboxybenzyllysine methyl ester hydrochloride are suspended in 50 ml of acetonitrile (abs.) and, after addition of 1.66 g of diethyl phosphite, the mixture is brought to reflux under protective gas in the presence of pulverized molecular sieve. After adding 1.2 g of paraformaldehyde the mixture

- 18 -

is heated at reflux until reaction is complete (about 3 h). The precipitate is filtered off and the filtrate is concentrated. The excess of diethyl phosphite is distilled off at 50°C on an oil pump. The residue is chromatographed on silica gel (eluent: ethyl acetate/methanol 95:5).

Yield: 1.5 g (84%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.4 (benzyl-H), 5.84 (-NH), 5.1 (benzyl-CH<sub>2</sub>), 4.3 (-CH-), 4.1 (POCH<sub>2</sub>), 3.1 (PCH<sub>2</sub>), 2.78 (NCH<sub>2</sub>), 1.9-1.4 (-CH<sub>2</sub>-), 1.3 (POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

ε-N-Di[N-methyl(phosphonyl)]lysine

200 g of ε-N-Di[N-methyl(diethylphosphonyl)]-α-N-carboxybenzyllysine methyl ester are heated at reflux for about 6 h in 10 ml of concentrated hydrochloric acid. After concentrating, 140 mg of residue are obtained.

Yield: 140 mg (97%)

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O): 3.98 (-CH-), 3.4 (PCH<sub>2</sub>), 2.0-1.3 (-CH<sub>2</sub>-) ppm.

3) Synthesis of Di[N-methyl(diethylphosphonyl)]glycine

Di[N-methyl(diethylphosphonyl)]benzylamine

1.07 g of benzylamine are dissolved in 30 ml of acetonitrile (abs.) and, after addition of 5.5 g of diethyl phosphite, the mixture is brought to reflux under protective gas in the presence of pulverized molecular sieve. After adding 1.2 g of paraformaldehyde the mixture is heated at reflux until reaction is complete (about 1 h). The precipitate is filtered off and the filtrate is concentrated. The excess of diethyl phosphite is distilled off at 50°C on an oil pump. The residue is chromatographed on silica gel (eluent: ethyl acetate/methanol 90:10).

Yield: 1.49 g (37%)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): 7.2 (benzyl-H), 4.1 (POCH<sub>2</sub>), 3.95 (benzyl-CH<sub>2</sub>), 3.1 (PCH<sub>2</sub>), 1.3 (POCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm.

## Di[N-methyl(phosphonyl)]benzylamine

1 g of di[N-methyl(diethylphosphonyl)]benzylamine is heated to reflux for about 2 h with 30 ml of concentrated hydrochloric acid. After concentrating, the residue is stirred with 10 ml of methanol. The precipitate is filtered off with suction, rendered alkaline with ammonium hydroxide solution and concentrated. The residue is chromatographed on silica gel (eluent: methanol/ammonium hydroxide solution 90:10).  
Yield: 300 mg (34%)  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 7.6 (benzyl-H), 4.7 (benzyl- $\text{CH}_2$ ), 3.55-3.35 ( $\text{PCH}_2$ ) ppm.

## Di[N-methyl(phosphonyl)]amine

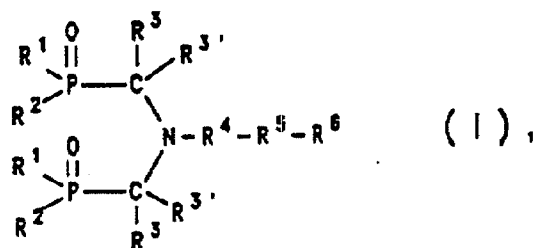
300 mg of di[N-methyl(phosphonyl)]benzylamine are dissolved in 5 ml of methanol and hydrogenated with palladium hydroxide on active carbon in a hydrogen atmosphere. After 4 hours, the palladium catalyst is filtered off and the solution is concentrated.  
Yield: 210 mg (95%)  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3.61-3.40 ( $\text{PCH}_2$ ) ppm.

## Di[N-methyl(diethylphosphonyl)]glycine

210 mg of di[N-methyl(diethylphosphonyl)]amine are dissolved in liquid ammonia and treated with 234 mg of sodium amide and 416 mg of sodium iodoacetate. After 8 h, the mixture is neutralized with ammonium chloride and the ammonia is evaporated. The residue is chromatographed on silica gel (eluent: methanol/ammonium hydroxide solution 100:0-1:1).  
Yield: 193 mg (72%).  
 $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 3.3 ( $\text{PCH}_2$ ), 3.95 ( $\text{NCH}_2$ ) ppm.

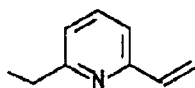
THE EMBODIMENTS OF THE INVENTION IN WHICH AN EXCLUSIVE  
PROPERTY OR PRIVILEGE IS CLAIMED ARE DEFINED AS FOLLOWS:

1. A substituted aminodialkylphosphonic acid of the  
formula (I)

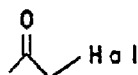


wherein

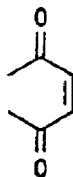
- 5  $\text{R}^1$  is hydroxyl, amino or thiol,  
 $\text{R}^2$  is hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched  
or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -alkyl, phenyl or benzyl,  
unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -alkoxy, phenoxy  
or benzyloxy, unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  
10  $\text{C}_4$ -alkylamino, phenylamino or benzylamino,  
unbranched or branched  $\text{C}_1$ - to  $\text{C}_4$ -mercaptoalkyl,  
thiophenyl or mercaptobenzyl,  
 $\text{R}^3$  and  $\text{R}^{3'}$  are identical or different and are  
hydrogen or  $(\text{C}_1\text{-C}_4)$ -alkyl,  
15  $\text{R}^4$  is unbranched or branched  $\text{C}_0$ - to  $\text{C}_6$ -alkylene or  
ortho-, meta-, or para- $\text{C}_7\text{-C}_{15}$ -aralkylene,  
 $\text{R}^5$  is amino, hydroxyl, thiol, an ester or an amide  
group,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-$ ,  $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$  or  $-\text{CH}(\text{OH})-$   
and  
20  $\text{R}^6$  is  $-\text{COOH}$  if  $\text{R}^5$  is  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-$ ,  $-\text{CH}(\text{NH}_2)-$  or  
 $-\text{CH}(\text{OH})-$ , or a group of the formula II or III if  
 $\text{R}^5$  is amino, hydroxyl or thio, or a group of the  
formula IV or V if  $\text{R}^5$  is amino,



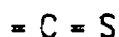
(II)



(III)



(IV)



(V)

or is  $-N_3-$ ,  $-Hal$  or  $-SH$ ,  $Hal$  being fluorine, chlorine, bromine or iodine and

$R^7$  is the side chain of a proteinogenic amino acid.

2. A compound according to formula I as claimed in claim 1,

5

wherein

$R^1$  is hydroxyl, amino or thiol,

$R^2$  is hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_4$ -alkyl, phenyl or benzyl, unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_4$ -alkoxy, phenoxy or benzyloxy,

10

$R^3$  and  $R^{3'}$  are hydrogen or  $(C_1-C_4)$ -alkyl,

$R^4$  is unbranched or branched  $C_0$ - to  $C_6$ -alkylene or ortho-, meta- or para- $C_7$ - $C_{15}$ -aralkylene,

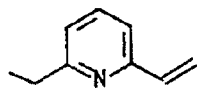
15

$R^5$  is amino, hydroxyl, thiol, an ester or an amide group,  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$

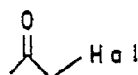
and

$R^6$  is  $-COOH$  if  $R^5$  is  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$ , or a group of the formula II or III if  $R^5$  is amino, hydroxyl or thio, or a group of the formula IV or V if  $R^5$  is amino,

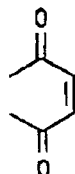
20



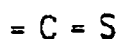
(II)



(III)



(IV)

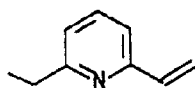


(V)

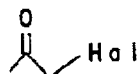
or is  $-N_3$ ,  $-Hal$  or  $-SH$ , Hal being chlorine, bromine or iodine and

$R^7$  is the side chain of a proteinogenic amino acid.

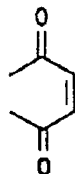
3. A compound according to formula (I) as claimed in  
 5 claim 1 or 2,  
 wherein  
 $R^1$  is hydroxyl, amino or thiol,  
 $R^2$  is hydrogen, hydroxyl, amino, thiol, unbranched  
 or branched  $C_1$ - to  $C_3$ -alkyl, phenyl or benzyl,  
 10 unbranched or branched  $C_1$ - to  $C_3$ -alkoxy, phenoxy  
 or benzyloxy,  
 $R^3$  and  $R^{3'}$  are hydrogen or  $(C_1-C_2)$ -alkyl,  
 $R^4$  is unbranched or branched  $C_0$ - to  $C_5$ -alkylene,  
 ortho-, meta- or para- $C_7-C_{12}$ -aralkylene,  
 15  $R^5$  is amino, hydroxyl, thiol, an ester or an amide  
 group,  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  $-CH(OH)-$ ,  
 $R^6$  is  $-COOH$  if  $R^5$  is  $-CH_2-$ ,  $-CH(R^7)-$ ,  $-CH(NH_2)-$  or  
 $-CH(OH)-$ , or is a group of the formula II or III  
 if  $R^5$  is amino, hydroxyl or thio, or a group of  
 20 the formula IV or V if  $R^5$  is amino,



(II)



(III)



(IV)



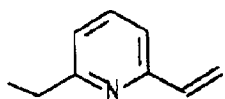
(V)

or is Hal, Hal being chlorine, bromine or iodine  
and

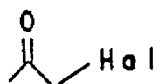
$R^7$  is the side chain of a proteinogenic amino acid.

4. A compound according to formula (I) as claimed in  
5 claims 1 to 3,  
wherein  
 $R^1$  is hydroxyl, amino or thiol,  
 $R^2$  is hydroxyl, amino or unbranched or branched  $C_1$ -  
to  $C_2$ -alkyl,  
10  $R^3$  and  $R^{3'}$  are hydrogen,  
 $R^4$  is unbranched or branched  $C_0$ - to  $C_5$ -alkylene,  
ortho-, meta- or para- $C_7$ - $C_{12}$ -aralkylene,  
 $R^5$  is amino, hydroxyl, an ester or an amide group,  
- $CH_2$ -, - $CH(R^7)$ -, - $CH(NH_2)$ - or - $CH(OH)$ -  
15 and  
 $R^6$  is -COOH if  $R^5$  is - $CH_2$ -, - $CH(R^7)$ -, - $CH(NH_2)$ - or  
- $CH(OH)$ - or a group of the formula II or III if  
 $R^5$  is amino or hydroxyl or a group of the formula  
IV if  $R^5$  is amino,

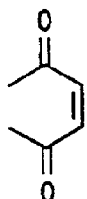




(II)



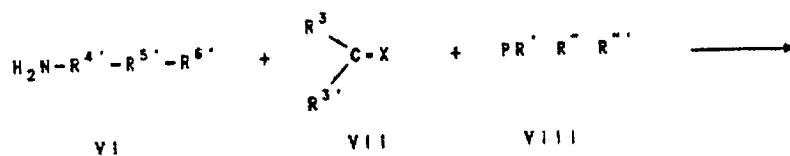
(III)



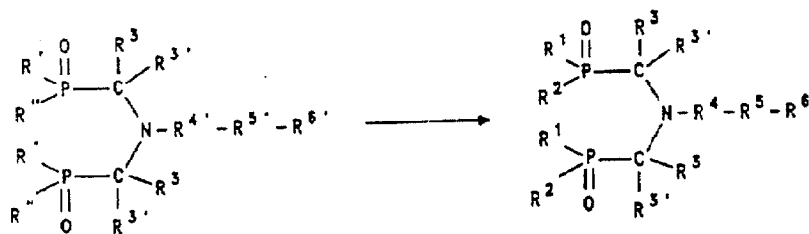
(IV)

or Hal, Hal being chlorine, bromine or iodine and  $R^7$  is the side chain of a proteinogenic amino acid.

5. A chelate complex containing one or two compounds of the formula I as claimed in claims 1 to 4 and at least one technetium or rhenium ion.
6. A conjugate containing a chelate complex as claimed in claim 5 and an organ-specific substance which is bound to a compound according to formula I via  $R^6$ .
7. A process for the preparation of a compound of the formula I as claimed in claims 1 to 4, which comprises reacting compounds of the formulae VI, VII and VIII to give a compound of the formula I'



and converting these in turn with removal of the protective groups on  $R^{4'}$ ,  $R^{5'}$  and  $R^{6'}$  to a compound of the formula I



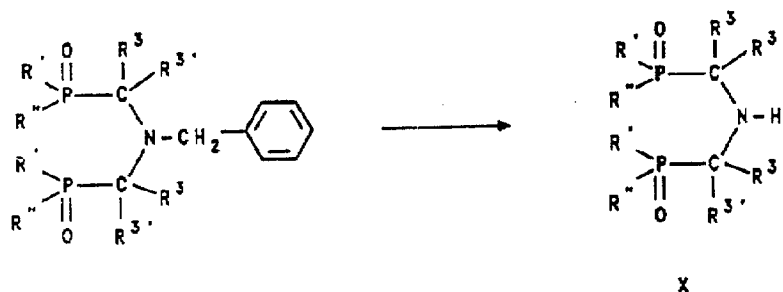
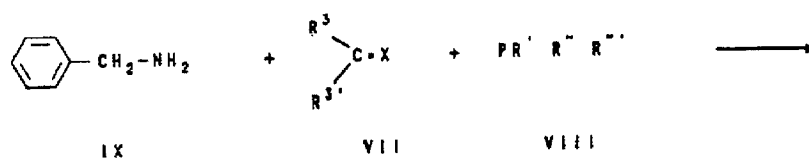
where

R<sup>4'</sup>, R<sup>5'</sup> and R<sup>6'</sup> are the groups R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup> and R<sup>6</sup> provided with protective groups,

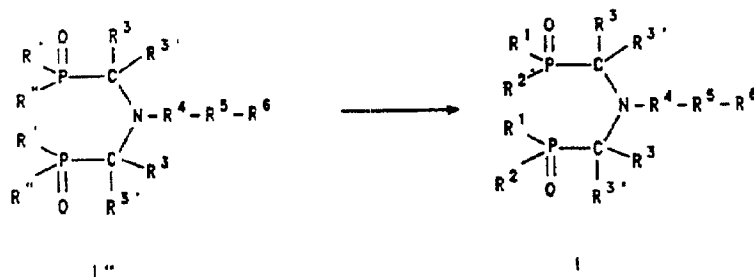
X is oxygen or nitrogen and

5 R', R'' and R''' are halogen, in particular chlorine, bromine, fluorine or a radical which applies to R<sup>2</sup>.

8. A process for the preparation of a compound of the formula I as claimed in claims 1 to 4, which  
10 comprises converting compounds of the formulae IX, VII and VIII with removal of the benzyl protective group to a compound of the formula X



and converting this with  $\text{Y-R}^4\text{-R}^5\text{-R}^6$  (XI) via a compound of the formula I" to a compound of the formula I



where

5  $\text{R}'$ ,  $\text{R}''$ ,  $\text{R}'''$  and  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  and  $\text{R}^6$  apply as defined in claim 7 and

$\text{Y}$  is halogen or tosylate, and also a carbonyl group which after coupling with the amine is converted via the imine formed to a methylene group.

10 9. A diagnostic containing a compound as claimed in claim 5 and an organ-specific substance.

10. A therapeutic containing a compound as claimed in claim 5 and an organ-specific substance.

- 27 -

11. A test kit for the detection of tumors, containing, spatially separated from one another, a compound as claimed in claim 4 bound to an organ-specific substance and a reductant which is capable of the reduction of the technetium from the pertechnetate to technetium(II).
- 5